

氏名	周 曉 華
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	薬 学
学位授与番号	博甲第2513号
学位授与の日付	平成15年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on the enhancing effect on neurite outgrowth by ascorbic acid derivatives and preventing effect on oxidative stress-induced neurite injury (アスコルビン酸誘導体による神経突起形成促進作用及び酸化ストレス誘導性神経突起傷害に対する保護効果に関する研究)
論文審査委員	教授 山本 格    教授 成松 鎮雄    教授 佐々木 健二

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

アスコルビン酸 (AsA) は抗壊血病作用をはじめとして、コラーゲンタンパク質の合成促進、抗酸化作用、メラニン色素の生成抑制、カテコールアミンの合成促進、発ガン予防、抗ウイルス作用など、多彩な生理作用を有することが知られている。一方、AsA は脳・神経組織に高濃度存在することが知られており、また、AsA がグリア細胞の増殖を介しドーパミン作動性ニューロンの形態変化や生物学的機能に影響を与えているとの報告もある。先に当研究室では安定型 AsA 誘導体、AA-2G を開発した。そしてこのものを AsA 供給源として用い、AsA の新規生理作用を検討する中で、AsA が PC12 細胞における NGF 誘導性神経突起形成を増強することを見いだした。しかし、その詳細については不明のままである。さらに最近、当研究室では AA-2G を分子修飾した新規油溶性 AsA 誘導体 6-Acyl-AA-2G を開発した。そこで今回著者は、AA-2G 及び 6-Acyl-AA-2G の PC12 及び Neuro2a 細胞の神経突起形成に及ぼす作用につき検討した。

AsA、AA-2G 及び 6-Acyl-AA-2G は、PC12 及び Neuro2a 細胞の神経突起形成に対して作用を示さなかったが、NGF あるいは  $Bt_2cAMP$  誘導性神経突起形成に対して促進作用を示した。これらの作用は他の抗酸化剤である GSH や 2-ME では認められなかった。AsA、AA-2G 及び 6-Acyl-AA-2G の投与後の細胞内 AsA 濃度を測定したところ、これらは異なった輸送機構により取り込まれ、用量並びに培養時間依存的に AsA 濃度が上昇することが観察された。6-Acyl-AA-2G のうち、特に 6-Octa-AA-2G は AsA 及び AA-2G と比較し作用が顕著であり、また、より早く作用が発現されることを認めた。さらに、これら AsA 誘導体の作用の本体は AsA であることが分かった。 $Bt_2cAMP$  誘導性神経突起形成にはリン酸化 MAPK, c-Jun, STAT3 の発現や  $Ca^{2+}$  の流入の up-regulation を伴うが、AsA はこれらの事象を増強することが明らかとなった。

さらに、AsA の酸化ストレスに対する神経細胞保護効果について検討を行った。神経毒性物質  $\beta$ -アミロイド、炎症性物質 LPS 及び過酸化水素は分化誘導中の Neuro2a 細胞の神経突起形成に障害をもたらすが、AA-2G の添加により神経突起の傷害は軽減された。よって、AsA は神経突起誘導促進作用のみならず、神経突起形成時の傷害抑制にも重要な保護的役割を果たしていると考えられる。

これらの知見は、AsA の神経系に対する新たな生理作用の一端を示すもので、神経細胞の代謝、シグナル伝達、細胞損傷の修復および老化など神経細胞の生命に重要な活性物質あることを示唆するものである。今後の研究において、6-Octa-AA-2G などの AsA 誘導体の活用が期待できる。

## 論文審査結果の要旨

抗壞血病ビタミンとして知られるアスコルビン酸 (AsA) は、コラーゲタンパク質の合成促進、抗酸化作用、メラニン色素の生成抑制、カテコールアミンの合成促進、発ガン予防、抗ウイルス作用など、多彩な生理作用を有している。また、AsAは脳・神経組織に高濃度存在することが知られており、グリア細胞の増殖を介しドーパミン作動性ニューロンの形態変化や生物学的機能に影響を与えているとの報告もある。

先に当研究室では安定型AsA誘導体、AA-2Gを開発した。そしてこのものをAsA供給源として用い、AsAの新規生理作用を検討する中で、AsAがPC12細胞におけるNGF誘導性神経突起形成を増強することを見出した。しかし、その詳細については不明のままである。さらに最近、当研究室ではAA-2Gを分子修飾した新規油溶性AsA誘導体6-Acyl-AA-2Gを開発した。今回著者は、AsA、AA-2G及び6-Acyl-AA-2Gを用いPC12及びNeuro2a細胞の神経突起形成に及ぼす作用とそのメカニズムについて検討した。

AsA、AA-2Gあるいは6-Acyl-AA-2Gは、PC12及びNeuro2a細胞の神経突起形成に対してそれ単独では作用を示さなかったが、NGFあるいはBt<sub>2</sub>cAMP誘導性神経突起形成に対して促進作用を示した。これらの作用は他の抗酸化剤であるGSHや2-MEでは認められなかった。AsA、AA-2G及び6-Acyl-AA-2Gの投与後の細胞内AsA濃度及び取り込み機構につき検討したところ、これらは異なった輸送機構により取り込まれ、用量並びに培養時間依存的にAsA濃度が上昇することが観察された。6-Acyl-AA-2Gのうち、特に6-Octa-AA-2GはAsAやAA-2Gと比較し上記作用が顕著であり、また、より早く作用が発現することを認めた。Bt<sub>2</sub>cAMP誘導性神経突起形成にはリン酸化MAPK、c-Jun、STAT3の発現やCa<sup>2+</sup>の流入のup-regulationを伴うが、AsA及びその誘導体はこれらの事象を増強することが明らかにした。

さらに、AsAの酸化ストレスに対する神経細胞保護効果について検討を行った。神経毒性物質β-アミロイド、炎症性物質LPS及び過酸化水素は分化誘導中のNeuro2a細胞の神経突起形成に障害をもたらすが、AA-2Gの添加により神経突起の傷害は軽減された。よって、AsAは神経突起誘導促進作用のみならず、神経突起形成時の傷害抑制にも重要な保護的役割を果たしていると考えられる。

これらの知見は、AsAの神経系に対する新たな生理作用の一端を示すもので、神経細胞の代謝、シグナル伝達、細胞損傷の修復および老化など神経細胞の生命に重要な活性物質あることを示唆するものである。これらの研究は6-Octa-AA-2GなどのAsA誘導体がAsAの生理・薬理活性の分子レベルでの解明に貢献できることを示した。よって、本論文は博士論文に値するものと認める。